

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b>  <b>C12M 3/00, 1/12</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 91/15570</b>  <b>(43) Date de publication internationale:</b> 17 octobre 1991 (17.10.91)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR91/00246 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 28 mars 1991 (28.03.91)  <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 90/04092 30 mars 1990 (30.03.90) FR  <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BERTIN & CIE [FR/FR]; B.P. N° 3, F-78373 Plaisir Cédex (FR).  <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> BINOT, Patrick [FR/FR]; 18, rue de Champagne, Rentilly, F-77600 Bus-sy-S.-Georges (FR). COGNARD, Dominique [FR/FR]; 73, boulevard Beethoven, F-78280 Guyancourt (FR). DUFU, Frédéric [FR/FR]; 9, hameau de Bois-Fontai-ne, F-78170 La Celle-S.-Cloud (FR). HACHE, Jean [FR/FR]; 3, allée de l'Épée, Voisins-le-Bretonneux, F-78190 Trappes (FR).		<b>(74) Mandataire:</b> CABINET ORES; 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).  <b>(81) Etats désignés:</b> AT (brevet européen), BE (brevet euro-péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>

**(54) Title:** CELL CULTURE DEVICE**(54) Titre:** DISPOSITIF DE CULTURE CELLULAIRE**(57) Abstract**

A cell culture device or a continuous mass bioreactor for obtaining improved products of said cultures comprises a cell cul-ture space (X) in which the cells are contained in a liquid medium. The space is bounded by walls at least three of which are selec-tively permeable, the first to the fresh nutrient medium, the second to gaseous fluids and the third to the spent nutrient medium. Means for circulating the fluids in the device are provided. The device is characterized in that the first wall consists of a layer of tubes (T) with a wall permeable to the fresh nutrient medium. The tubes are mounted parallel between an input manifold (42) and an outlet manifold (43) in a closed-loop circuit (10, 11, 16) and include means for supplying (10; 40) the fresh nutrient medium. The flow rate of fresh medium between the ends of each tube is several times greater than that passing through its wall.

**(57) Abrégé**

Dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur en masse et en continu permettant notamment l'obtention améliorée des pro-duits desdites cultures, du type comprenant un espace de culture cellulaire (X) dans lequel les cellules sont confinées dans un mi-lieu liquide, ledit espace étant délimité par des parois dont au moins trois sont sélectivement perméables, la première au milieu nutritionnel frais, la seconde aux fluides gazeux et la dernière au milieu nutritionnel usé et des moyens de circulation des fluides dans ledit dispositif, lequel dispositif est caractérisé en ce que la première paroi est constituée par une nappe de tubes (T) à paroi perméable au milieu nutritionnel frais, lesdits tubes étant montés en parallèle entre un collecteur d'entrée (42) et un collecteur de sortie (43) dans un circuit en boucle fermée (10, 11, 16), incluant des moyens d'apport (10; 40) dudit milieu nutritionnel frais et étant parcourus chacun de bout en bout par un débit de milieu frais plusieurs fois supérieur à celui traversant sa paroi.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	SD	Soudan
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KR	République de Corée	SN	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	LI	Licchtenstein	SU	Union soviétique
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark				

**DISPOSITIF DE CULTURE CELLULAIRE.**

La présente invention est relative à un dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur en masse et en continu permettant notamment l'obtention améliorée des produits desdites cultures.

On connaît actuellement plusieurs méthodes et dispositifs de culture cellulaire.

Les cellules peuvent être mises en culture sur une surface lisse telle que verre ou plastique approprié (boîtes ou tubes). De telles cultures ne permettent pas de réaliser une croissance cellulaire importante et nécessitent de grandes quantités de nutriments.

En particulier, les Brevets US 3 883 393 (USA), 3 997 396 (MONSANTO Co.), 4 087 327, 4 201 845 (MONSANTO Co.), 4 220 725 (USA) et 4 391 912 décrivent des systèmes dans lesquels les cellules sont cultivées sur ou à proximité de fibres creuses.

Le Brevet 4 201 845 (MONSANTO Co.) décrit notamment un réacteur de culture cellulaire comprenant une chambre de culture dans laquelle une couche de fibres creuses pour l'alimentation gazeuse est prise en sandwich entre une membrane microporeuse pour la distribution du milieu de culture et une membrane microporeuse servant de barrière à la diffusion des cellules à l'extérieur de ladite chambre. Le flux de milieu est dirigé vers le haut et transversalement au plan des fibres.

Ce dispositif présente cependant un certain nombre d'inconvénients et notamment des risques de colmatage de la membrane distributrice de milieu de culture, en raison de l'attaque frontale de ladite membrane, lequel colmatage entraîne des inégalités locales de débit et une non homogénéité de la distribution des nutriments.

Dans certains de ces dispositifs, et notamment dans le dispositif MONSANTO, la distribution et la répartition du milieu vers les cellules n'est pas réalisée de

façon homogène sur toute la surface de la plaque, pouvant entraîner des disparités difficiles à maîtriser dans le métabolisme des cellules, suivant leur position dans le dispositif et des difficultés d'extrapolation de taille  
5 du dispositif, notamment dans le cadre d'une réalisation industrielle.

La Demanderesse s'est en conséquence donné pour but de pourvoir à un bioréacteur ou dispositif de culture cellulaire qui répond mieux aux besoins de la  
10 pratique que les dispositifs de l'Art antérieur, notamment en ce qu'il permet la production de produits de culture, en continu et en masse, à partir de cultures maintenues à haute concentration cellulaire supérieure à  $5.10^8/\text{cm}^3$ , sur une longue période sans entraîner de col-  
15 matage c'est-à-dire sans diminution du débit de nutriments dans tout l'espace cellulaire et l'utilisation d'un espace cellulaire de dimension importante, mieux adapté à l'échelle industrielle.

La présente invention a pour objet un dispositif de culture cellulaire ou bioréacteur notamment pour  
20 la production de métabolites, du type comprenant un espace de culture cellulaire dans lequel les cellules sont confinées dans un milieu liquide, -ledit espace étant délimité par des parois dont au moins trois sont sélective-  
25 ment perméables, la première au milieu nutritionnel frais, la seconde aux fluides gazeux et la dernière au milieu nutritionnel usé- et des moyens de circulation des fluides dans ledit dispositif, caractérisé en ce que la première paroi est constituée par une nappe de tubes à  
30 paroi perméable au milieu nutritionnel frais, lesdits tubes étant montés en parallèle entre un collecteur d'entrée et un collecteur de sortie dans un circuit en boucle fermée incluant des moyens d'apport dudit milieu nutritionnel frais et étant parcourus chacun de bout en

bout par un débit de milieu frais plusieurs fois supérieur à celui traversant sa paroi.

On entend, au sens de la présente invention, par milieu frais, un milieu riche en nutriments, fourni  
5 aux cellules, pour leurs besoins et leur croissance.

On entend par milieu usé, un milieu appauvri en nutriments et contenant les métabolites excrétés par lesdites cellules.

Selon une caractéristique avantageuse de ce  
10 dispositif, le débit du milieu parcourant chaque tube correspond à une vitesse d'écoulement, de l'ordre du dm/s, qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais à travers la paroi desdits tubes.

Selon une autre caractéristique dudit disposi-  
15 tif, lesdits tubes sont rigides et de diamètre de l'ordre du centimètre, leur paroi ayant des pores d'un diamètre permettant le passage des molécules de nutriments et notamment le passage des molécules d'un poids moléculaire supérieur à 150kDa et présentent une perte de charge à  
20 travers la paroi d'environ 200 mbars.

De tels tubes ont l'avantage d'être stérilisables et permettent d'obtenir une homogénéité de distribution des nutriments, avec une dispersion maximale de l'ordre de 10 %.

25 Selon encore une autre caractéristique avantageuse de ce dispositif, le circuit en boucle est maintenu sous une pression appropriée, calculée de telle sorte, qu'elle permette d'obtenir le rapport recherché entre le débit circulant et le débit traversant et de vaincre la  
30 pression capillaire.

Selon une autre caractéristique avantageuse de ce dispositif, la seconde paroi est constituée par un ensemble de capillaires à paroi perméable aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former, de l'un  
35 et/ou de l'autre côté de la nappe de tubes, un/plusieurs

sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges gazeux avec les cellules.

Lesdits sous-ensembles de capillaires peuvent être simples, c'est-à-dire sous la forme d'une seule  
5 couche ou bien être eux-même formés de plusieurs couches superposées de capillaires parallèles entre eux, les capillaires d'une couche régnant au droit des intervalles entre capillaires des deux couches adjacentes.

Les cellules qui peuvent être mises en culture  
10 dans le dispositif de la présente invention sont notamment les microorganismes et les cellules animales ou végétales procaryotes et eucaryotes. Elles peuvent éventuellement avoir été modifiées ; elles peuvent éventuellement être fixées sur un support.

15 Lesdits capillaires diffusent le gaz qui les traversent (air, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO, CO<sub>2</sub> etc...) de manière homogène à l'intérieur de l'espace de culture cellulaire.

Selon une disposition préférée de cette caractéristique, lesdits capillaires sont des fibres creuses  
20 de diamètre de l'ordre du millimètre, à paroi hydrophobe.

La multiplication de la surface de distribution des gaz et notamment de l'oxygène entraîne une diminution des distances de diffusion et permet ainsi, grâce à une oxygénation plus intense et plus homogène sans  
25 stress mécanique, une viabilité nettement améliorée des cellules ainsi qu'une évacuation du CO<sub>2</sub> produit par les cellules.

De manière inattendue, le mode d'alimentation par filtration tangentielle au travers de tubes poreux  
30 évite les problèmes de colmatage, assure une distribution homogène du milieu dans l'espace de culture, entraînant ainsi une meilleure productivité et homogénéité de l'ensemble des cellules.

De plus, l'apport de nutriments à l'aide de  
35 tubes permet de simplifier et de maîtriser l'hydrodynamique.

que globale du bioréacteur et la mise en place d'un réseau de fibres d'aération permet d'apporter directement l'oxygène au milieu des cellules dans un espace cellulaire important et ainsi de commander, de façon indépendante l'apport de nutriments, l'oxygénation et l'extraction des produits de la culture cellulaire.

Selon une autre caractéristique avantageuse de ce dispositif, la troisième paroi comprend au moins un tamis micronique constituant chaque paroi aval de l'espace de culture cellulaire, pour assurer le confinement des cellules en permettant la sortie du milieu usé.

Selon une disposition préférée de cette caractéristique, ledit tamis micronique recouvre au moins chaque face libre aval de l'ensemble des capillaires.

Selon une autre disposition préférée de cette caractéristique, ladite troisième paroi est une membrane poreuse comprenant des pores d'un diamètre compris entre 1 et 10  $\mu\text{m}$  et avantageusement sélectionnée parmi les membranes organiques et les membranes métalliques.

Selon une autre caractéristique avantageuse d'un dispositif conforme à l'invention, les capillaires sont orientés parallèlement au plan de la nappe des tubes.

Selon une disposition préférée de cette caractéristique, les capillaires sont parallèles aux tubes.

Selon une modalité préférée de cette disposition, lesdits capillaires sont aussi répartis dans l'espace cellulaire libre entre les tubes.

Selon une autre caractéristique avantageuse d'un dispositif conforme à l'invention, la nappe de tubes et chaque ensemble ou sous-ensemble de capillaires sont séparés par un tamis micronique semblable au tamis micronique formant la troisième paroi dudit dispositif.

Selon une autre caractéristique avantageuse d'un dispositif conforme à l'invention, il constitue un

module unilatéral, comprenant un seul ensemble de capillaires situé d'un côté de la nappe de tubes et au moins un tamis micronique aval ou de sortie.

Selon encore une autre caractéristique avantageuse d'un dispositif conforme à l'invention, il constitue un module bilatéral ou symétrique, comprenant au moins deux sous-ensembles de capillaires s'étendant respectivement de chaque côté de la nappe de tubes et au moins un tamis micronique aval ou de sortie, recouvrant chaque sous-ensemble de capillaires.

Selon encore une autre caractéristique avantageuse d'un dispositif conforme à l'invention, il comprend au moins deux modules symétriques superposés, les espaces de sortie et tamis microniques intermédiaires étant éventuellement supprimés.

Ledit dispositif peut également comprendre une enceinte traversée par au moins deux jeux de nappes de tubes, l'espace entre les tubes et les tamis microniques d'extrémité étant rempli de capillaires parallèles auxdits tubes.

En variante, le dispositif conforme à l'invention comprend une enceinte traversée par au moins deux nappes de tubes, formant en alternance des parois d'entrée et de sortie du milieu et dont l'espace entre les tubes est rempli de capillaires parallèles auxdits tubes, les tubes de sortie du milieu ayant les propriétés d'un tamis micronique.

Le bioréacteur conforme à l'invention permet de résoudre un certain nombre de problèmes :

30 cellules : - augmentation de productivité et bonne utilisation du volume de l'espace cellulaire ;

- diminution des risques d'endommagement ;
- augmentation de la viabilité et concen-



tration cellulaire augmentée et plus homogène, par diminution de la distance de diffusion de l'oxygène et par un apport homogène de nutriments ;

- 5                   - possibilité de cultiver des cellules fixées ou des cellules libres.

nutriments : - diminution des besoins en sérum, du fait de la forte concentration cellulaire, ce qui entraîne une diminution du coût ;

- 10                   - boucle de recirculation des nutriments ;  
                  - limitation des risques de colmatage à l'alimentation, par l'application d'une filtration tangentielle.

production : le dispositif conforme à l'invention a l'avantage d'être particulièrement bien adapté aux applications industrielles, nécessitant des facilités d'extrapolation en taille.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente une vue schématique d'ensemble d'un bioréacteur conforme à l'invention ;  
                  - la figure 2 représente une vue schématique  
25 du bioréacteur en coupe orthogonale par rapport aux tubes ;  
                  - la figure 3 représente une vue en coupe du bioréacteur selon la ligne 3-3 de la figure 2 ;  
                  - la figure 4 est une vue en coupe de la zone  
30 d'alimentation selon la ligne 4-4 de la figure 2 ;  
                  - les figures 5a à 5g représentent schématiquement des modes de réalisation différents du bioréacteur conforme à l'invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces  
35 dessins et les parties descriptives correspondantes, sont

donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

On se réfère d'abord aux figures 1 à 4, qui illustrent des modes de réalisation du bioréacteur conforme à l'invention.

La figure 1 représente une vue schématique d'un bioréacteur conforme à l'invention, comprenant dans un carter D délimité par un espace de culture cellulaire X :

- 10 . un premier tamis micronique  $M_1$  qui assure le confinement des cellules dans l'espace X mais permet le passage du milieu usé à récupérer,
- . un premier sous-ensemble de capillaires C qui assurent le passage des fluides gazeux et qui sont disposés entre le tamis  $M_1$  et une nappe de tubes T, parallèles entre eux et qui assurent le passage du milieu nutritif frais vers les cellules,
- 15 . un second tamis micronique  $M_2$  qui assure le confinement des cellules dans l'espace X, à l'autre extrémité dudit espace et un deuxième sous-ensemble de capillaires C, disposé entre le tamis  $M_2$  et la nappe de tubes T.
- 20

Les tubes T sont montés en parallèle entre deux collecteurs 42 et 43 (figure 4) alimentés suivant un circuit en boucle fermée incluant une tubulure d'entrée 10 (figure 1), 40 (figure 4) d'apport du milieu nutritionnel frais et une tubulure 11 (figure 1), 41 (figure 4) de sortie dudit milieu frais à recycler, lesquelles tubulures sont reliées entre elles par une canalisation 16 (figure 1).

Des conduits  $12_1$  et  $12_2$  de sortie du milieu usé (figures 1 et 3), débouchant en aval des tamis  $M_1$  et  $M_2$  permettent d'extraire ledit milieu usé collecté entre les tamis et le carter D.

Des moyens d'entrée Ge et de sortie Gs des fluides gazeux (figure 2) sont reliés respectivement à un volume d'alimentation 45 des capillaires C et un volume 46 d'échappement des capillaires.

5 Dans la réalisation illustrée à la figure 1 :

- les capillaires C sont, dans le même plan, perpendiculaires aux tubes T et sont disposés en deux sous-ensembles, de part et d'autre de la nappe de tubes T ;

10 - le dispositif comprend en outre, associé à la canalisation 16 de circulation de milieu frais, des moyens de mise sous pression 14, 15 dudit milieu frais. Le milieu frais sous pression circulant dans les tubes T, entre l'entrée 10 et la sortie 11, est recyclé en permanence dans une boucle alimentée à partir d'un réservoir 15 13 branché sur la canalisation 16 ; une filtration tangentielle dudit milieu frais à travers lesdits tubes T dans l'espace de culture cellulaire X peut ainsi être assurée.

20 Dans une réalisation avantageuse du dispositif de l'invention, le moyen 14 est réalisé par une vanne d'étranglement introduisant une perte de charge et le moyen 15 est ménagé par une pompe.

Dans une variante, le bioréacteur conforme à 25 l'invention peut également comprendre les moyens suivants, non représentés à la figure 1 :

- en amont de l'entrée gazeuse Ge, on peut trouver un filtre stérile ;

- l'espace de culture cellulaire X peut être 30 associé à un dispositif de régulation de la température ;

- la boucle de recirculation de milieu frais (tubulures 10 et 11) et les conduits d'évacuation de milieu usé (moyens 12<sub>1</sub> et 12<sub>2</sub>) peuvent être associés à des réservoirs appropriés.

Le fonctionnement de tels bioréacteurs est le suivant :

Après stérilisation du carter D et réglage de la température, du pH, de la concentration en oxygène, du  
5 débit en milieu approprié additionné en sérum, on inocule une quantité appropriée de cellules dans l'espace de culture cellulaire X et l'on introduit le milieu frais par le moyen d'apport 40 vers le collecteur 42 (figure 4). On surveille quotidiennement la concentration en nutriments  
10 du milieu frais ainsi que les paramètres précisés ci-dessus (température, pH, concentration en  $O_2$ ). Le milieu frais s'écoule à travers les tubes T à une vitesse qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais à travers les parois desdits tubes et assure ainsi une homogénéité de l'alimentation des cellules inoculées  
15 situées dans l'espace de culture cellulaire X. Le milieu frais non utilisé et récupéré à la sortie 41, par l'intermédiaire du collecteur 43, est recyclé en permanence dans une boucle sous pression alimentée à partir d'un réservoir 13 branché sur la canalisation 16 et ali-  
20 mente à nouveau les cellules. Le milieu utilisé est, pour sa part, récupéré avec les métabolites produits par les cellules au niveau des conduits de sortie 12<sub>1</sub> et 12<sub>2</sub> (figure 3) et traité ultérieurement de manière appropriée.

25 Simultanément, les cellules sont alimentées en oxygène par l'intermédiaire des capillaires C, répartis uniformément dans l'espace laissé libre par les tubes T, dans l'espace délimité par les tamis microniques d'extrémité, à partir d'une arrivée gazeuse Ge  
30 (figure 2). Les capillaires diffusent le gaz de l'intérieur de chaque capillaire vers les cellules mais s'opposent à la diffusion de liquide à l'intérieur desdits capillaires. La sortie Gs des gaz permet également l'évacuation du  $CO_2$  produit par les cellules en culture.

. la sortie de gaz Gs permet d'évacuer l'oxygène non utilisé et le CO<sub>2</sub> produit par les cellules en culture.

Un tel bioréacteur d'un volume qui peut varier  
5 de 200 cm<sup>3</sup> à 10 l, permet de réaliser des cultures en continu sur une période de plusieurs mois.

Dans une réalisation préférée mais non limitative dudit bioréacteur :

. l'espace de culture cellulaire X a 25 mm de  
10 haut et est délimité par deux tamis microniques (M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub>, figure 1) de 250 x 400 mm.

. les tubes T d'alimentation en milieu frais, sont d'un diamètre de l'ordre de 1 cm, sont rigides et ont des pores d'un diamètre permettant le passage de  
15 molécules de nutriments d'un poids moléculaire supérieur à 150 kDa. Ces tubes sont dans la réalisation représentés et ce de manière non limitative, en graphite compacté recouvert d'une couche sensible permettant le contrôle du diamètre des pores, ont été préalablement stérilisés et  
20 la mise sous pression du milieu frais entraîne une perte de charge, lorsque le milieu frais traverse les parois des tubes T, supérieure à 200 mbars.

. les capillaires C d'alimentation en fluides gazeux, sous la forme d'une pluralité de fibres creuses  
25 poreuses espacées régulièrement dans l'espace cellulaire X, d'un diamètre de 2,6 mm dans la réalisation représentée, sont situés de part et d'autre desdits tubes T, orientés parallèlement au plan des tubes T et perpendiculaires à ceux-ci dans ledit plan.

30 Après stérilisation du carter D, on inocule, par exemple et ce de manière non limitative, 2.10<sup>6</sup> d'hybridomes murins VO208 qui produisent un anticorps monoclonal de type IgG1/ml de volume utile. Les conditions expérimentales sont alors les suivantes : pH de  
35 croissance 7,2 ; pH de production d'anticorps 7,05 ;

concentration en  $O_2$  dissous, environ 40 % ; température 37°C.

Le milieu frais est ensuite introduit par la tubulure d'entrée 40 vers le collecteur 42 (figure 4) et comprend par exemple du glucose (concentration résiduelle toujours supérieure à 0,8 g/l), de la glutamine (2 à 4 %), des acides aminés (1 % dans le bioréacteur), un milieu RPMI 1640 (on diminue le taux de recirculation lorsque la concentration en lactate est supérieure ou égale à 18mM) et du sérum de veau foetal à 10 % dont on diminue le taux à partir du 20ème ou du 25ème jour jusqu'à moins de 2 %. On dose quotidiennement le glucose et le lactate et régulièrement on dose la glutamine et les acides aminés et on mesure le pH. Ce milieu s'écoule dans les tubes T à une vitesse qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais ci-dessus défini à travers les parois desdits tubes à une vitesse de l'ordre de 10  $\mu\text{m/s}$  et assure une homogénéité de l'alimentation des cellules situées dans l'espace de culture cellulaire X.

De manière préférée, la vitesse d'écoulement à l'intérieur des tubes est de l'ordre de 1 dm/s et la pression est choisie de manière à obtenir le rapport recherché (par exemple 10:1) entre le débit circulant et le débit traversant la paroi du tube.

Le milieu usé est récupéré aux sorties 12<sub>1</sub> et 12<sub>2</sub> et comprend notamment dans la réalisation représentée les anticorps monoclonaux produits par lesdits hybridomes.

On se réfère maintenant aux modes de réalisation illustrés aux figures 5a à 5g.

La figure 5a illustre un mode de réalisation du bioréacteur conforme à l'invention, comprenant un carter D qui enferme une nappe de tubes T. Entre la nappe de tubes T et le tamis micronique M, est disposé un ensemble de capillaires, disposés perpendiculairement aux tubes T,

dans le même plan et formant ainsi un "module unilatéral".

La figure 5b illustre un autre mode de réalisation du bioréacteur conforme à l'invention, pour un "module bilatéral" ou symétrique, qui comprend deux sous-ensembles de capillaires C s'étendant respectivement de chaque côté de la nappe de tubes T, deux tamis micro-  
5 niques d'extrémité  $M_1$  et  $M_2$  et deux tamis microniques  $M'_1$  et  $M'_2$  semblables aux tamis microniques  $M_1$  et  $M_2$  et séparant chaque sous-ensemble de capillaires C de la nappe de  
10 tubes T.

Les membranes  $M'_1$  et  $M'_2$  permettent le confinement des cellules dans l'espace où la distribution d'oxygène est homogène (près des capillaires et évitent  
15 le colmatage des tubes).

La figure 5c illustre un mode de réalisation d'un bioréacteur conforme à l'invention dans lequel deux modules symétriques sont superposés entre deux tamis d'extrémité  $M_1$  et  $M_2$ , lequel bioréacteur comprend suc-  
20 cessivement un premier sous-ensemble de capillaires C, un tamis micronique  $M'_1$ , une nappe de tubes T, un tamis micronique  $M'_2$ , un deuxième sous-ensemble de capillaires C, un tamis micronique  $M_{1a}$ , un espace de sortie intermédiaire puis un autre module symétrique tel que décrit ci-  
25 dessus.

La figure 5d illustre un mode de réalisation dans lequel on trouve un empilement de plusieurs modules symétriques comme visible à la figure 5c et dont l'espace de sortie intermédiaire est supprimé.

30 Aux figures 5a à 5d ci-dessus, les capillaires C sont perpendiculaires aux tubes T dans le plan de ceux-ci, alors qu'aux figures 5e à 5g ci-après, les tubes et les capillaires sont parallèles.

La figure 5e illustre schématiquement un  
35 module bilatéral ou symétrique qui comprend un ensemble

de capillaires C emplissant tout l'espace laissé libre par la nappe de tubes T, entre les tamis microniques  $M_1$  et  $M_2$  d'extrémité.

La figure 5f illustre schématiquement un mode de réalisation dans lequel une enceinte E est traversée par plusieurs nappes de tubes T, T'. Les nappes de tubes T sont inclus dans les boucles fermées de recirculation du milieu frais.

Ces nappes de tubes T' permettent l'évacuation du milieu usé, les tubes T' ayant les propriétés d'un tamis micronique M. L'enceinte E comprend en outre un ensemble de capillaires C parallèles aux tubes T, T', qui emplissent l'ensemble de l'espace de culture cellulaire X entre les tubes T et T'. Les entrées 50 et les sorties 51 sont reliées aux tubes T et les sorties 52 sont reliées aux tubes T'.

La figure 5g illustre un mode de réalisation dans lequel une enceinte E est traversée par plusieurs nappes de tubes  $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$  dans lesquels circule en boucle fermée le milieu nutritif frais et est emplie d'un ensemble de capillaires C parallèles auxdits tubes et comprend en outre deux tamis microniques  $M_1$  et  $M_2$  d'extrémité.

Comme le montrent les figures 5f et 5g et comme cela est prévu pour toutes les variantes, la ou les nappes de tubes T sont alimentées en milieu frais et les capillaires C sont alimentés en gaz approprié.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.



REVENDICATIONS

1') Dispositif de culture cellulaire ou bio-réacteur pour la production de métabolites, du type comprenant un espace de culture cellulaire (X) dans lequel  
5 les cellules sont confinées dans un milieu liquide, ledit espace étant délimité par des parois dont au moins trois sont sélectivement perméables, la première au milieu nutritionnel frais, la seconde aux fluides gazeux et la dernière au milieu nutritionnel usé et des moyens de cir-  
10 culation des fluides dans ledit dispositif, caractérisé en ce que la première paroi est constituée par une nappe de tubes (T) à paroi perméable au milieu nutritionnel frais, lesdits tubes étant montés en parallèle entre un collecteur d'entrée (42) et un collecteur de sortie (43)  
15 dans un circuit en boucle fermée (10,11,16), incluant des moyens d'apport (10 ; 40) dudit milieu nutritionnel frais et étant parcourus chacun de bout en bout par un débit de milieu frais plusieurs fois supérieur à celui traversant sa paroi.

20 2') Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le débit du milieu parcourant chaque tube (T) correspond à une vitesse d'écoulement, de l'ordre du dm/s, qui garantit la filtration tangentielle du milieu frais à travers la paroi desdits tubes.

25 3') Dispositif selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdits tubes (T) sont rigides et de diamètre de l'ordre du centimètre, leur paroi ayant des pores d'un diamètre permettant le passage des molécules de nutriments.

30 4') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le circuit en boucle (10,11,16) est maintenu sous une pression appropriée, calculée de telle sorte, qu'elle permette d'obtenir le rapport recherché entre le débit circulant

et le débit traversant et de vaincre la pression capillaire.

5') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la seconde  
5 paroi est constituée par un ensemble de capillaires (C) à paroi perméable aux gaz, disposés à intervalle sensiblement égaux pour former, de l'un et/ou de l'autre côté de la nappe de tubes (T), un/plusieurs sous-ensembles à distribution homogène pour les échanges  
10 gazeux avec les cellules.

6') Dispositif selon la revendication 5, caractérisé en ce que lesdits sous-ensembles de capillaires peuvent être simples, c'est-à-dire sous la forme d'une seule couche.

7') Dispositif selon la revendication 5, caractérisé en ce que lesdits sous-ensembles de capillaires peuvent être eux-même formés de plusieurs couches superposées de capillaires parallèles entre eux, les capillaires d'une couche régnant au droit des intervalles  
20 entre capillaires des deux couches adjacentes.

8') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5, 6 ou 7, caractérisé en ce que lesdits capillaires sont des fibres creuses de diamètre de l'ordre du millimètre, à paroi hydrophobe.

9') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la troisième paroi comprend au moins un tamis micronique constituant chaque paroi aval de l'espace de culture cellulaire, pour assurer le confinement des cellules permettant la sortie  
30 du milieu utilisé.

10') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 5 à 8 et 9, caractérisé en ce que ledit tamis micronique (M) recouvre au moins chaque face libre aval de l'ensemble des capillaires.

11') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ladite troisième paroi est une membrane poreuse comprenant des pores d'un diamètre compris entre 1 et 10  $\mu\text{m}$ .

5 12') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que les capillaires (C) sont orientés parallèlement au plan de la nappe des tubes (T).

10 13') Dispositif selon la revendication 12, caractérisé en ce que les capillaires (C) sont parallèles aux tubes (T).

15 14') Dispositif selon la revendication 13, caractérisé en ce que lesdits capillaires (C) sont aussi répartis dans l'espace cellulaire libre entre les tubes (T).

15'') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la nappe de tubes (T) et l'ensemble ou sous-ensembles de capillaires (C) sont séparés par un tamis micronique ( $M'_1$ ,  $M'_2$ ) semblable au tamis micronique (M) formant la troisième paroi dudit dispositif.

16') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il constitue un module unilatéral, comprenant un seul ensemble de capillaires (C) situé d'un côté de la nappe de tubes (T) et au moins un tamis micronique aval (ou de sortie) (M).

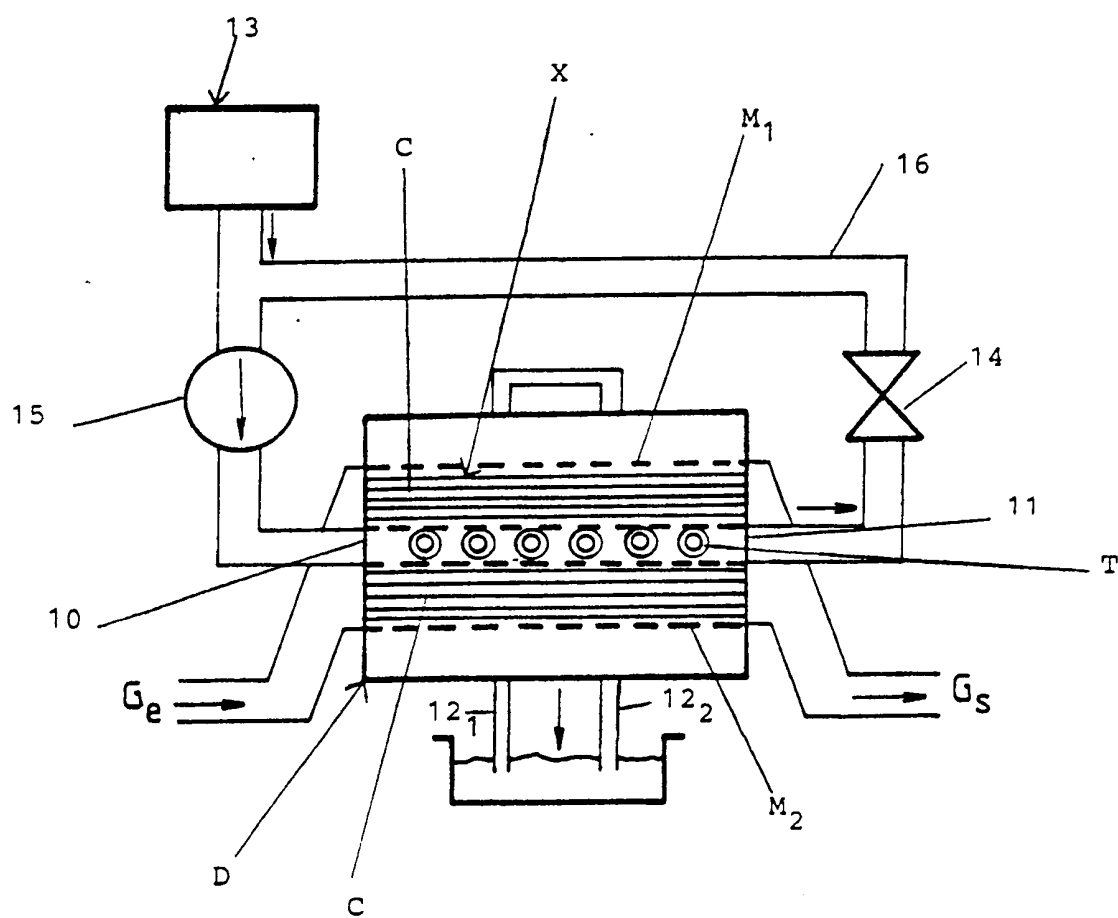
17') Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il constitue un module bilatéral ou symétrique, comprenant au moins deux sous-ensembles de capillaires (C) s'étendant respectivement de chaque côté de la nappe de tubes (T) et au moins un tamis micronique aval (ou de sortie) ( $M_1$ ,  $M_2$ ), recouvrant chaque sous-ensemble de capillaires (C).

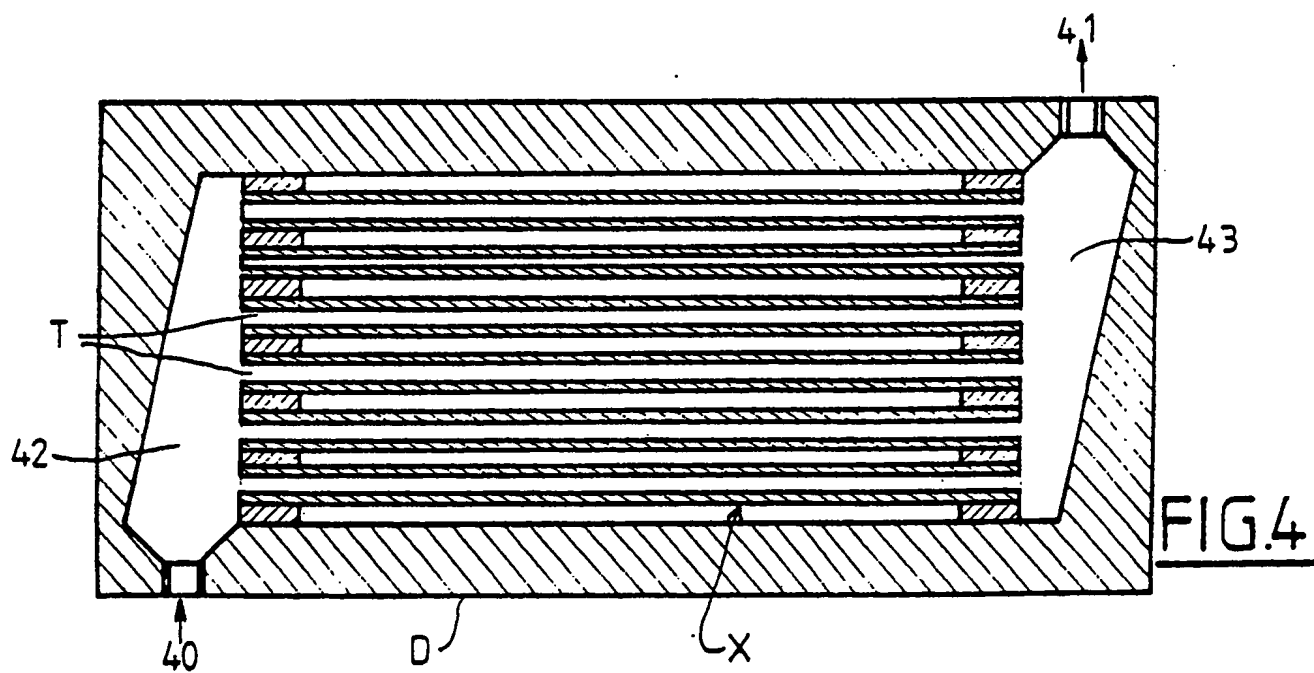
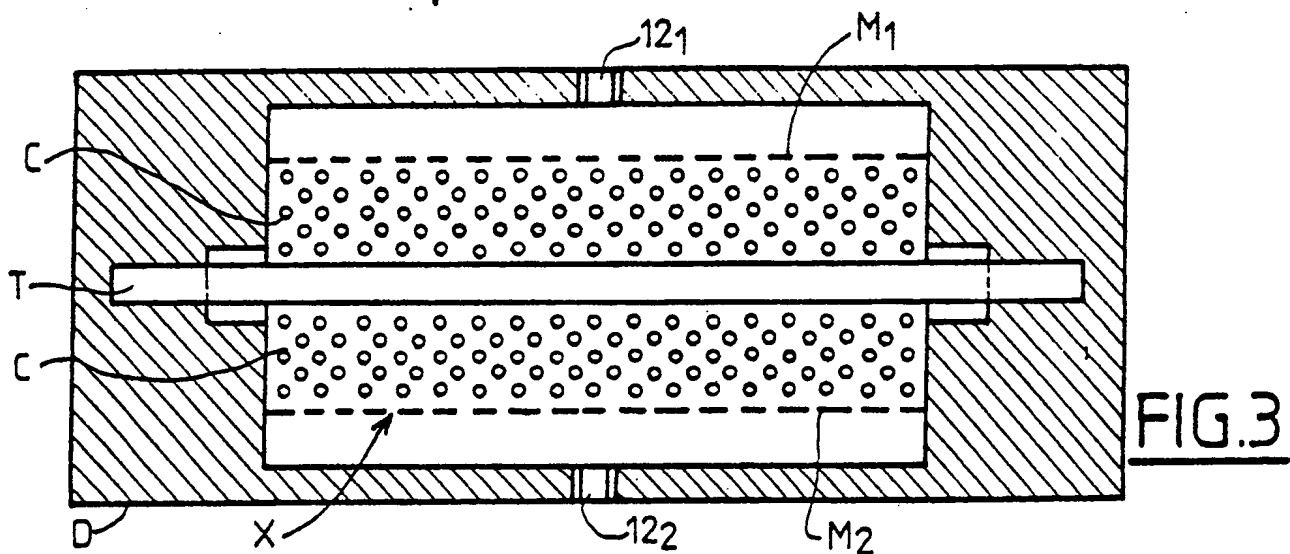
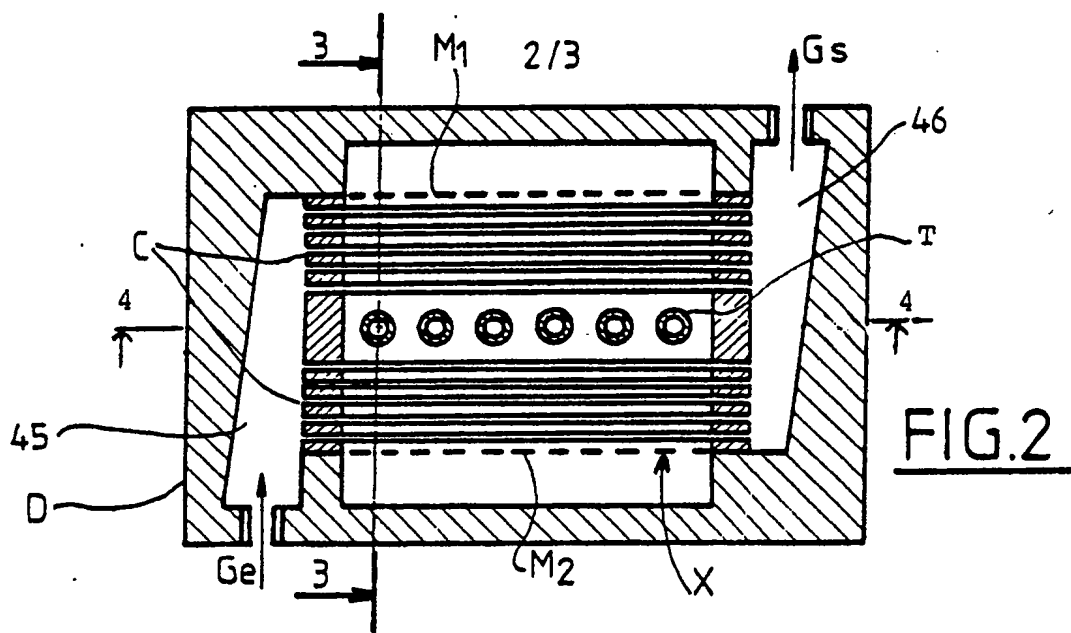
18') Dispositif selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux modules sy-

métriques superposés, avec suppression éventuelle des espaces de sortie et tamis microniques intermédiaires.

5 19') Dispositif selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend une enceinte (E) traversée par au moins deux jeux de nappes de tubes (T,T'), formant en alternance des parois d'entrée et de sortie et dont l'espace entre les tubes est rempli de capillaires (C) parallèles auxdits tubes, les tubes (T') ayant les propriétés d'un tamis micronique (M).

10 20') Dispositif selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend une enceinte (E) traversée par au moins deux nappes de tubes (T) et dont l'espace entre les tubes (T) est rempli de capillaires (C) parallèles auxdits tubes, entre deux tamis microniques  
15 (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>) d'extrémité.

FIG.1



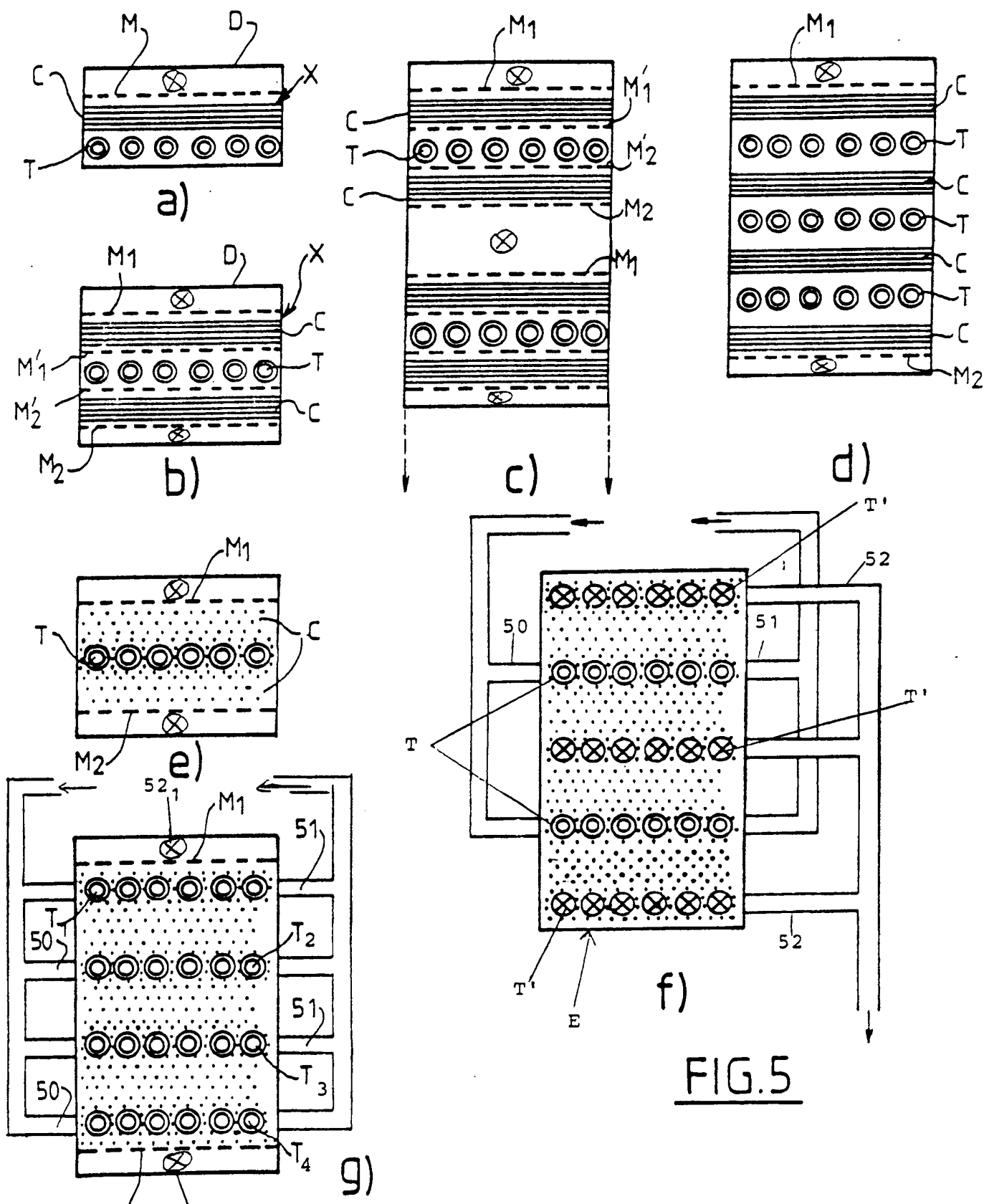


FIG. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR91/00246

<b>I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER</b> (If several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
IPC <sup>5</sup> : C12M 3/00, 1/12		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
IPC <sup>5</sup>	C12M	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
P, Y	WO, A, 9013639 (INVITRON CORP.) 15 November 1990 see page 10, line 24 - page 17, line 21 ---	1-20
Y	US, A, 4610789 (H.W. BARCH) 9 September 1986 see claims ---	1-20
A	WO, A, 8606094 (LYONNAISE DES EAUX) 23 October 1986 see claims 1-11; figures ---	1-20
A	EP, A, 0113328 (MONSANTO CO.) 11 July 1984 see page 14, line 13 - page 17, line 12; claims 1,3-5,9-13; figure 3 ---	1-20
A	Biotechnology & Bioengineering, volume 28, No. 3, March 1986, John Wiley & Sons, Inc., (New York, US), J.P. Tharakan et al.: "A radial flow hollow fiber bioreactor for the large- scale culture of mammalian cells", pages 329-342 see abstract; figure 1 -----	1-20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>10</sup> Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
12 July 1991 (12.07.91)	2 September 1991 (02.09.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		



**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9100246

SA 46482

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 22/08/91  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 9013639	15-11-90	AU-A- 5639490	29-11-90
US-A- 4610789	09-09-86	None	
WO-A- 8606094	23-10-86	FR-A- 2580514	24-10-86
		EP-A,B 0224496	10-06-87
		JP-T- 63500351	12-02-88
EP-A- 0113328	11-07-84	US-A- 4537860	27-08-85
		CA-A- 1210352	26-08-86
		DE-A- 3377800	29-09-88
		JP-A- 59118080	07-07-84

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 91/00246

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup> -		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB <sup>5</sup> : C 12 M 3/00, 1/12		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB <sup>5</sup>	C 12 M	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>11</sup> avec indication, si nécessaire, des passages pertinents <sup>12</sup>	N° des revendications visées <sup>13</sup>
P, Y	WO, A, 9013639 (INVITRON CORP.) 15 novembre 1990 voir page 10, ligne 24 - page 17, ligne 21 --	1-20
Y	US, A, 4610789 (H.W. BARCH) 9 septembre 1986 voir revendications --	1-20
A	WO, A, 8606094 (LYONNAISE DES EAUX) 23 octobre 1986 voir revendications 1-11; figures --	1-20
A	EP, A, 0113328 (MONSANTO CO.) 11 juillet 1984 voir page 14, ligne 13 - page 17, ligne 12; revendications 1, 3-5, 9-13; figure 3 -- ./.	1-20
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup></p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« &amp; » document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICAT N</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
12 juillet 1991	02. 09. 91	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé Danielle van der Haas	

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	<p>Biotechnology &amp; Bioengineering, vol. 28, no. 3, mars 1986, John Wiley &amp; Sons, Inc., (New York, US),  J.P. Tharakan et al.: "A radial flow hollow fiber bioreactor for the large-scale culture of mammalian cells",  pages 329-342  voir abrégé; figure 1</p> <p>-----</p>	1-20

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9100246  
SA 46482

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.  
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 22/08/91  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 9013639	15-11-90	AU-A- 5639490	29-11-90
US-A- 4610789	09-09-86	Aucun	
WO-A- 8606094	23-10-86	FR-A- 2580514	24-10-86
		EP-A,B 0224496	10-06-87
		JP-T- 63500351	12-02-88
EP-A- 0113328	11-07-84	US-A- 4537860	27-08-85
		CA-A- 1210352	26-08-86
		DE-A- 3377800	29-09-88
		JP-A- 59118080	07-07-84